

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

20 NOV. 1978

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

PATENTE DE INVENCION

19 ES	11 NUMERO	10 A1
21	469.925	
22	FECHA DE PRESENTACION	
	17-5-1978	

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
77/05883-2	18-5-1977	Suecia

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D 1/04	

64 TITULO DE LA INVENCION

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE ACIDO CITRICO"

71 SOLICITANTE (S)

MICRO-CHEM DEVELOPMENT LABORATORY AB (Case 300)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

Sandbacksgatan 10, S-116 21 Estocolmo, Suecia

72 INVENTOR (ES)

Refaat M. El-Sayed

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ (P.-68.997)

jga

POOR QUALITY

Durante largo tiempo, el suero se ha utilizado para la alimentación animal. Mas recientemente, debido entre otras cosas al desarrollo de métodos para ultracentrifugación del suero, se han separado las proteínas del suero, lo que significa que se obtienen grandes cantidades de permeato de suero. Este permeato tiene un contenido muy bajo de proteínas mientras que las concentraciones de lactosa y sales son aproximadamente las mismas que en el suero. El permeato de suero, con sus bajos contenidos de proteínas, se considera hoy en día como un producto de desecho y, como tiene un gran consumo biológico de oxígeno BS (DOD_7), es un producto de desecho costoso de tratar.

Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que los altos contenidos de lactosa en el permeato de suero, pueden utilizarse en un procedimiento nuevo para la producción de ácido cítrico.

El ácido cítrico se utiliza en gran escala en la industria alimentaria como sustancia aromatizante, y puede utilizarse también en cierta extensión en las industrias farmacéutica y química técnica. Por ejemplo, el ácido cítrico se puede utilizar como agente complejante en compuestos de limpieza y para la depuración de gases de chimenea.

Los métodos de producción de ácido cítrico empleados en la actualidad son muy antiguos. El método más común es todavía aquél en el que se fermenta *Aspergillus Niger* en la superficie en recipientes abiertos utilizando melazas como fuente de carbono, preferiblemente melazas procedentes de la remolacha azucarera. Existen actualmente métodos modernos de inmersión, con o sin cultivo continuo,

pero éstos únicamente se han puesto en aplicación comercial en un pequeño número de casos.

5 Todos los métodos comerciales de la actualidad están basados en el uso de sacarosa como fuente de carbono, en su mayoría en la forma de melazas. En menor escala, se han utilizado hidrolizado y almidón como fuentes de carbono. Adicionalmente, en la patente de EE.UU. 3.717.549 se ha propuesto un método para la producción de ácido cítrico, en el que una cepa de fermentación acumulativa de ácido cítrico se fermenta en condiciones aerobias. Como 10 fuentes de carbono adecuadas, se proponen almidón, melazas, sacarosa, glucosa, maltosa, dextrina, fructosa o galactosa.

15 La lactosa es una forma de azúcar que se presenta principalmente en la leche. Además, existen sólo un pequeño número de microorganismos que pueden utilizar lactosa como fuente de carbono. Estos microorganismos están presentes usualmente en la leche y son capaces de formar

20 -galactósidos. Por consiguiente, representaría una gran ventaja económica el que fuera posible utilizar la lactosa contenida en el suero o en el permeato de suero como fuente de carbono en la fabricación de ácido cítrico, en comparación con el uso de otros tipos de azúcar o hidrolizados de celulosa o almidón como fuente de carbono.

25 De acuerdo con la presente invención, se ha comprobado sorprendentemente ahora que es posible producir ácido cítrico en un procedimiento en dos etapas por cultivo de microorganismos adecuados mientras que se utiliza lactosa como fuente de carbono. Para poder utilizar la lactosa 30 como fuente de carbono, la lactosa tiene que transformarse

en ácido pirúvico, el cual se puede transformar más tarde en ácido cítrico. El problema estriba en conseguir que el ácido pirúvico se concentre en la solución de cultivo de tal manera que el mismo pueda transformarse en ácido cítrico por la influencia de microorganismos.

Así pues, en este procedimiento, tiene que evitarse la transformación del ácido pirúvico en CO_2 . Adecuadamente, esto puede lograrse influyendo en el metabolismo aerobio de los microorganismos. Una tal influencia puede conseguirse, por ejemplo, por adición de cianuros que envenenan la respiración de los microorganismos, por disminución de la adición de oxígeno, o por adición de anermicina.

Así, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de ácido cítrico, procedimiento que se caracteriza por el hecho de que *E. Coli* KG 93, F⁻ se cultiva en una primera etapa durante 15-24 horas a una temperatura de 20-37°C y a un pH de 5,0-7,5 sobre un sustrato constituido por permeato de suero al que se han añadido fosfatos en concentración de 0,8-1,6 g/litro y nitratos en concentración de 0,8-1,2 g/litro o una cantidad correspondiente de urea, por el hecho de que *H. Wickerhamii* CBS 4308 se cultiva en una segunda etapa durante 20-26 horas a una temperatura de 15-35°C y un pH de 4,5-6,5 en la solución de cultivo procedente de la primera etapa después de lo cual se obtiene ácido cítrico de la solución de cultivo de una manera conocida per se.

Un sustrato adecuado que puede utilizarse en el cultivo es un permeato de suero que tiene la composición media dada a continuación:

	<u>Porcentaje en peso</u>
	materia grasa 0,10-0,30
	proteínas 0,01-0,1
	lactosa 4,5 - 5,5
5	sales 0,2 -0,8
	ácido láctico 0,05-0,15

estando el resto constituido por agua.

Dado que existe una deficiencia principal-
mente en compuestos nitrogenados en el substrato, la mis-
ma tiene que complementarse con nitratos o urea. Para ello,
10 puede utilizarse un solo nitrato o una mezcla de dos o más
nitratos. Por ejemplo, el nitrato de potasio es un compues-
to adecuado. Adicionalmente, tiene que añadirse fósforo al
substrato, y lo más conveniente es añadirlo en la forma de
15 un fosfato tal como KH_2PO_4 , K_2HPO_4 ó $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$. Podrían
utilizarse también otros fosfatos y compuestos de fósforo.
El substrato tiene que complementarse de tal modo que el
contenido de fosfato sea 0,8-1,6 g/litro, preferiblemente
1,2 g/litro, y el contenido de nitrato 0,8-1,2 g/litro, pre-
20 feriblemente 1,0 g/litro. Entonces, en lugar de nitrato,
se puede añadir una cantidad correspondiente de urea.

La cepa de microorganismos (*Escherichia Coli*
KG 93, F⁻) que se utiliza en la primera etapa se seleccio-
na con respecto a su capacidad para formar ácido pirúvico,
25 mientras que la cepa de microorganismos (*Hansenula Wicker-*
hamii CBS 4308) que se emplea en la segunda etapa se selec-
ciona con respecto a su aptitud para formar ácido cítrico.

Convenientemente, ambas etapas del cultivo se
llevan a cabo continuamente. Cuando se transfiere el líqui-
do de cultivo procedente de la primera etapa a la segunda,
30

no es necesario por regla general destruir el E. Coli.

A menudo existe especialmente una diferencia en temperatura y pH entre las dos etapas, lo cual tiene como efecto el que las células transferidas de E. Coli no puedan competir con las de H. Wickerhamii. No obstante, si se desea, E. Coli puede destruirse después de la primera etapa:

Es especialmente ventajoso realizar el cultivo en la primera etapa a una temperatura de aproximadamente 37°C y un pH de aproximadamente 7. Preferiblemente, al comienzo en la primera etapa del cultivo, se lleva a cabo con un suministro de aire que se interrumpe después que han transcurrido aproximadamente las dos terceras partes del tiempo de cultivo. Generalmente, la primera etapa se da por terminada al cabo de aproximadamente 18 horas.

Es preferible tener una temperatura de aproximadamente 30°C y un pH de aproximadamente 5 en la segunda etapa.

El valor del pH del sustrato en las dos etapas puede regularse de modos diferentes. Por ejemplo, se puede utilizar amoníaco gaseoso.

Frecuentemente, se hace una adición de 0,1-0,5 g/litro de cianuro, por ejemplo en forma de ferrocianuro o ácido cianoscético, en la segunda etapa del cultivo. En lugar de dicho cianuro puede utilizarse aneromicina.

Como se ha mencionado arriba, el ácido cítrico se puede recuperar de la segunda etapa de un modo conocido per se. Por ejemplo, puede utilizarse una precipitación con carbonato de calcio o hidróxido de calcio, y una filtración subsiguiente.

La invención se explicará más en detalle en relación con los ejemplos de realización que se muestran a continuación:

Ejemplo 1

5 Se utilizó un permosto de suero que tenía la composición siguiente:

	<u>Porcentaje en peso</u>
materia grasa	0,20
proteínas	0,05
10 lactosa	5,0
ácido láctico	0,1
sales	0,6

y el resto, constituido por agua.

15 El 0,6 por ciento en peso de sales arriba indicado podía dividirse de la manera siguiente:

	<u>Porcentaje en peso</u>
Ca	0,06
P	0,06
K	0,16
20 N	0,03
NaCl	0,3

El permosto se complementó con 1,2 g/litro de fosfatos y 1,0 g/litro de nitratos.

25 El permosto de suero complementado se bombeó a un fermentador continuo (Chemap R), que estaba provisto de un agitador de turbina. La solución se inoculó con E. Coli KG 93, F⁻. El cultivo se llevó a cabo a una temperatura de 37°C y a un pH de aproximadamente 7. El pH se mantuvo en un valor estable por medio de amoníaco gaseoso. Se suministró aire al cultivo por medio de un compresor.

30

Al cabo de aproximadamente 12 horas de cultivo, se interrumpió completamente el suministro de aire para conseguir cierta concentración de ácido pirúvico. Después de aproximadamente otras 6 horas de cultivo sin suministro de aire, se bombeó continuamente el líquido procedente del fermentador a otro fermentador del mismo tipo y se inoculó en éste con *H. Wickerhamii* CBS 4308. Esta segunda etapa del cultivo se llevó a cabo a una temperatura de 30°C y un pH de aproximadamente 5. El cultivo de la segunda etapa se continuó durante aproximadamente 24 horas. Asimismo, en la segunda etapa, el pH se mantuvo en un valor estable por medio de amoníaco gaseoso. Durante el cultivo de la segunda etapa se añadieron 0,3 g/litro de ferrocianuro.

El rendimiento de ácido pirúvico en la etapa primera fue 32 g/litro. El rendimiento de ácido cítrico después de la totalidad del procedimiento era 43 g/litro.

Ejemplo 2

Se repitió el procedimiento del ejemplo 1 con la excepción de que la primera etapa del cultivo (con *E. Coli* KG 93, F⁻) se llevó a cabo a una temperatura de 32°C y un valor de pH de 6,5. El cultivo se realizó al principio durante 16 horas con suministro de aire y luego durante 8 horas sin suministro de aire. La segunda etapa del cultivo (con *H. Wickerhamii* CBS 4308) se llevó a cabo durante 23 horas a una temperatura de 25°C y a un valor de pH de 5,5. El rendimiento de ácido cítrico fue 32 g/litro.

Ejemplo 3

Se repitió el procedimiento de acuerdo con el

ejemplo 1 con la excepción de que la primera etapa de cultivo se efectuó a una temperatura de 37°C y a un valor de pH de 7,5. El cultivo se realizó al principio durante 14 horas con suministro de aire y luego durante 7 horas sin suministro de aire. La segunda etapa de cultivo se realizó durante 22 horas a una temperatura de 30°C y a un valor de pH de 5,5. No se efectuó adición alguna de ferrocianuro. El rendimiento de ácido cítrico fue 42 g/litro.

Ejemplo 4

Se repitió el procedimiento de acuerdo con el ejemplo 1. Sin embargo, la primera etapa de cultivo se llevó a cabo a una temperatura de 37°C y a un valor de pH de 6,5. El cultivo se realizó al principio durante 16 horas con suministro de aire y luego durante 8 horas sin suministro de aire. Además, la segunda etapa del cultivo se llevó a cabo durante 24 horas a una temperatura de 25°C y a un valor de pH de 5,0. El rendimiento de ácido cítrico fue 50 g/litro.

Ejemplo 5

Se repitió el procedimiento de acuerdo con el ejemplo 1, con la excepción de que la primera etapa del cultivo se llevó a cabo a una temperatura de 32°C y a un valor de pH de 6,5. El cultivo se efectuó al principio durante 16 horas con suministro de aire y luego durante 8 horas sin suministro de aire. Adicionalmente, la segunda etapa de cultivo se llevó a cabo durante 24 horas a una temperatura de 25°C y a un valor de pH de 6,5. El rendimiento de ácido cítrico fue 1,6 g/litro.

La invención no se limita a las realizaciones indicadas, ya que éstas pueden modificarse en diferentes formas dentro del alcance de la presente invención.

REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

5
10
15
20
25
30
1068

1ª.- Un procedimiento para la obtención de ácido cítrico, caracterizado por el hecho de que se cultiva en una primera etapa E. Coli KG 93, F⁻ durante 15-24 horas a una temperatura de 20-37°C y a un pH de 5,0-7,5 sobre un sustrato constituido por permeato de suero al que se han añadido fosfatos en una concentración de 0,8-1,6 g/litro y nitratos en una concentración de 0,8-1,2 g/litro o una cantidad correspondiente de urea, y por el hecho de que se cultiva en una segunda etapa H. Wickerhamii CBS 4308 durante 20-26 horas a una temperatura de 15-35°C y a un pH de 4,5-6,5 en la solución de cultivo procedente de la primera etapa, después de lo cual se obtiene ácido cítrico de la solución de cultivo de un modo conocido per se.

2ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, caracterizado por el hecho de que el cultivo en la primera etapa se lleva a cabo al comienzo con suministro de aire, el cual se interrumpe al cabo de aproximadamente los 2/3 del tiempo de cultivo.

3ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª ó 2ª, caracterizado por el hecho de que el cultivo en la primera etapa se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 37°C y a un pH de aproximadamente 7.

4ª.- Un procedimiento de acuerdo con una cual

[Handwritten signature]

quiere de las reivindicaciones 1ª a 3ª, caracterizado por el hecho de que el cultivo en la primera etapa se lleva a cabo durante aproximadamente 18 horas.

5 5ª.- Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1ª-4ª, caracterizado por el hecho de que el cultivo en la segunda etapa se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 30°C y a un pH de aproximadamente 5.

10 6ª.- Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 5ª, caracterizado por el hecho de que el valor de pH se ajusta por medio de amoníaco gaseoso.

15 7ª.- Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 6ª, caracterizado por el hecho de que el cultivo en la segunda etapa se lleva a cabo con un suministro de cianuro que asciende a 0,1-0,5 g/litro.

20 8ª.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 6ª, caracterizado por el hecho de que el cultivo en la segunda etapa se lleva a cabo con un suministro de aneromicina.

9ª.- UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE ACIDO CITRICO.

25 Tal y como se ha descrito en la memoria que antecede, y con los fines que se han especificado.

Esta memoria consta de diez hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 07 JUN 1970

P.A.

Fernando de Elizburu
Per Fidei

30
1068
OCM

